

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING



**KAJIAN KERAGAMAN GENETIK *Phalangersp.* ASAL PAPUA
BERDASARKAN SEKUEN GEN *Cytochrome c Oxidase* SubUnit-1 (*COX1*),
12S rRNA, DAN *NADH Dehidrogenase* SubUnit 4L (ND4L)**

**Elizabeth Novi Kusumaningrum, S.Si, M.Si NIDN 0005117008
Drs. Budi Prasetyo, M.Si NIDN 0028125907**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS TERBUKA
2014**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian

: Kajian Keragaman Genetik *Phalangersp.* Asal Papua Berdasarkan Sekuen Gen *Cytochrome c Oxidase* SubUnit-1 (*COXI*), 12S rRNA, dan *NADH Dehidrogenase* SubUnit 4L (*ND4L*)

Peneliti/Pelaksana:

a. Nama Lengkap : Elizabeth Novi Kusumaningrum, S.Si, M.Si
b. NIDN : 0005117008
c. Jabatan Fungsional : Lektor
d. Program Studi : Biologi
e. Nomor HP : 081282284375
f. Alamat surel (e-mail) : novi@ut.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Drs. Budi Prasetyo, M.Si
b. NIDN : 0028125907
c. Perguruan Tinggi : Universitas Terbuka

Tahun Pelaksanaan

: Tahun ke 1 (satu) dari rencana 2 (dua) tahun

Biaya Tahun Berjalan

: Rp. 67.000.000,-

Biaya Keseluruhan

: Rp. 150.000.000,-

Tangerang Selatan, Desember 2014



Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian/Pengabdian
Masyarakat Universitas Terbuka

(Ir. Kristanti Ambar Puspita, M.Ed, Ph.D)
NIP. 196102121986032001

Ketua Peneliti

(Elizabeth Novi Kusumaningrum, S.Si, M.Si)
NIP. 197011052001122001

RINGKASAN

Phalanger sp. salah satu dari famili *Phalangeridae* merupakan satwa endemik dari wilayah Indonesia timur yang secara hukum dilindungi melalui diterbitkannya Peraturan Perburuan Binatang Liar (PPBL) no 226/1931, UU no 5/1990, UU no 7/1999, dimasukkannya ke daftar IUCN dalam kategori *endangered species*, dalam CITES, digolongkan dalam Apendix II, serta dilakukan konservasi *in-situ* maupun *ex-situ*. Jika tidak segera dilakukan tindakan pencegahan dan pelestarian, maka akan menambah daftar satwa yang telah punah. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkaji keragaman genetik gen *Cytochrome c Oxidase* SubUnit-1 (*COX1*), 12S rRNA, dan *NADH Dehydrogenase* SubUnit 4L (ND4L) pada *Phalanger* sp. asal Papua. Deoksiribonukleotida (DNA) yang diisolasi dari darah *Phalanger* sp. untuk digunakan sebagai DNA cetakan dalam proses amplifikasi dengan metode PCR. Primer yang digunakan dalam penelitian didesain untuk mengamplifikasi gen *Cytochrome c Oxidase* SubUnit-1 (*COX1*), 12S rRNA, dan *NADH Dehydrogenase* SubUnit 4L (ND4L). Hasil sekuensing dengan gen 12S rRNA memperlihatkan bahwa kedua sampel darah tersebut adalah *Phalanger* sp.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan Penelitian Hibah Bersaing.....	ii
Ringkasan	iii
DAFTAR ISI	iv
I. BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
C. Manfaat Penelitian.....	3
D. Luaran Penelitian	4
II. BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Kuskus.....	5
B. Perilaku Kuskus Di Alam.....	6
C. Konservasi	6
D. DNA Mitokondria	7
III. BAB III. METODE PENELITIAN	9
A. Tempat dan Waktu Penelitian	9
B. Bahan dan Alat	10
C. Prosedur Kerja	10
1. Isolasi DNA Total DNA	11
2. Amplifikasi Gen COX1, 12S rRNA, dan ND4L	11
3. Elektroforesis Hasil PCR Gen COX1, 12S rRNA, dan ND4L.....	12
5. Analisis Data	12
IV. BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	13
V. BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	20
VII. BAB VII. DAFTAR PUSTAKA	21

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Penelitian

Papua merupakan provinsi yang memiliki keanekaragaman hayati tertinggi di Indonesia. Papua menyumbang sekitar 30 – 50% keanekaragaman hayati Indonesia (Conservation international, 1999), sebagai salah pulau yang mendukung tingginya keanekaragaman hayati Indonesia, tidak hanya memiliki kekayaan jenis yang tinggi, tetapi juga memiliki tingkat endemisitas jenis (species endemism) yang tinggi dibandingkan dengan pulau-pulau lain di Indonesia. Papua terdiri atas provinsi Papua dan Papua Barat, mempunyai luas 42,22 juta hektare yang meliputi 10,61 juta hektare hutan lindung, 8,02 juta hektare hutan pelestarian dan konservasi, 9,26 juta hektare hutan produksi, 1,67 juta hektare kawasan perairan, dan 10,5 juta hektare hutan produksi. Tidak ada keanekaragaman hayati yang seunik Papua di dunia. Kekayaan alam daratan dan Lautan pulau Papua terdiri atas spesies endemik yang banyak dan beragam ekosistem. Menurut perkiraan yerdapat kurang lebih 25.000 spesies tumbuhan berkayu, 164 spesies mamalia, 329 spesies amfibia dan reptilia, 650 spesies burung, dan 1200 spesies ikan laut, dapat dikatakan bahwa Papua hampir memiliki separuh dari kekayaan keanekaragaman hayati yang ada di Indonesia (Conservation international, 1999). Kekayaan alam dan keanekaragaman kehidupan yang luar biasa di Asia Tenggara yang dimiliki oleh Papua meliputi keanekaragaman jenis-jenis fauna diantaranya mamalia darat. Tercatat kurang lebih 200 jenis mamalia darat terdapat di Papua dan 154 jenis diantaranya telah diketahui membentuk populasi-populasi besar yang meliputi jenis endemik maupun jenis-jenis introduksi (Petocz, 1987).

Walaupun Papua menjadi rumah bagi tingginya keanekaragaman hayati, namun saat ini, Papua sedang menghadapi pembangunan sosial dan ekonomi yang buruk perencanaannya, yang semakin meningkat sejak pemerintah pusat memberikan status Otonomi Khusus untuk Papua sejak tahun 2001. Pembangunan yang cepat dan sering tanpa perencanaan yang baik telah meningkatkan kerusakan habitat di Papua, yang secara negatif berdampak terhadap keanekaragaman hayati yang unik dan ekosistem alamiahnya, juga pembangunan itu sendiri. Keanekaragaman hayati tersebut semakin terancam dengan adanya berbagai kegiatan ekonomi misalnya pengalih fungsian lahan menjadi perkebunan sawit, hutan tanaman industri hingga pertambangan. Papua mendapat peringkat pertama dalam indeks kualitas lingkungan yang dikeluarkan pada 2006 dengan 76 persen tutupan lahan. Kondisi tersebut merosot menjadi peringkat 17 pada tahun 2012. Penyebabnya bukan masalah tutupan lahan ataupun kualitas udara, tapi kualitas air yang diakibatkan aktivitas pertambangan yang terjadi di hulu sungai.

Ancaman lainnya adalah perkebunan sawit yang mulai merambah tanah Papua tersebut. Diperkirakan saat ini luasan perkebunan sawit di Papua mencapai 100.000 ribu hektare. Luas tersebut dua kali lipat dari perkiraan sebelumnya. Selain itu, dampak negatif terhadap kehidupan sosial, budaya dan ekonomi pun mengikutinya. Keanekaragaman hayati yang kaya di Papua akan punah jika tidak dikelola dengan bijaksana. Sangat disayangkan, banyak aspek dari keanekaragaman hayati yang belum dipahami, tetapi jika terus dibiarkan menghadapi berbagai aktivitas pembangunan, maka suatu saat tingginya keanekaragaman hayati Papua hanya tinggal sejarah. Oleh karena itu, usaha perlindungan, pengawetan dan pemanfaatan yang berkelanjutan perlu dilakukan, yang umum dikenal sebagai usaha konservasi keanekaragaman hayati.

Perubahan lingkungan hutan menjadi perladangan, pertanian, industri, pemukiman, jalan, padang alang-alang dan sebagainya mengakibatkan berkurang atau makin kecilnya populasi jenis-jenis tertentu. Beberapa jenis endemik dan langka mungkin sudah punah di habitat aslinya sebelum diketahui potensinya. Kondisi hayati Indonesia yang mulai memprihatinkan oleh karena populasinya semakin menurun akibat semakin sempitnya habitat yang ditempati. Selain itu karena pemanenan hayati yang tidak diimbangi dengan usaha konservasi. Salah satu contoh kekayaan hayati yang terancam punah (*endangered*) adalah *Phalanger* sp. Petocz (1987), menyebutkan bahwa dari 11 jenis kuskus yang terdapat di New Guinea 5 diantaranya telah dilindungi oleh pemerintah Indonesia melalui SK. Menteri Pertanian No. 247 / KPTS / UM / 4 / 1979 yaitu *Phalanger orientalis* (Kuskus Timur), *Phalanger maculatus* (Kuskus Bertotol Biasa), *Phalanger gymnotis* (Kuskus Kelabu), *Phalanger vestitus* (Kuskus Rambut Sutra) dan *Phalanger rufoniger* (Kuskus Totol Hitam).

Saat ini sebagian besar dari famili *Phalangeridae* secara hukum dilindungi melalui diterbitkannya Peraturan Perburuan Binatang Liar (PPBL) no 226/1931, UU no 5/1990, UU no 7/1999, dimasukkannya ke daftar IUCN dalam kategori *endangered species*, dalam CITES, digolongkan dalam Apendix II, serta dilakukan konservasi *in-situ* maupun *ex-situ*. Namun kenyataannya pemerintah belum mampu menghentikan perburuan dan perdagangan satwa liar ilegal. Jika tidak segera dilakukan tindakan pencegahan dan pelestarian, maka akan menambah daftar satwa yang telah punah. Kisaran persebaran satwa ini cukup luas, dimulai dari bagian timur Indonesia, Papua New Guinea, Cape York hingga Queensland di Australia. Lebih jauh disebutkan terdapat 11 jenis kuskus di New Guinea dan beberapa pulau di sekitarnya. Namun secara mendalam mengenai perilaku, persebaran dan jenisnya belum diketahui secara pasti (Menzies, 1991).

Belakangan ini sejumlah penelitian membuktikan bahwa mitokondria DNA (mtDNA) dapat digunakan sebagai penanda maternal (Hou *et al.*, 2006). Hal ini didukung dengan kelebihan-kelebihan yang dimiliki oleh mtDNA yang umumnya tidak dijumpai pada DNA inti, seperti ukuran mtDNA sekitar 16,5 kb lebih kecil dibanding DNA inti, laju evolusi yang sangat cepat, diturunkan dari garis maternal serta dapat diperoleh dari sampel yang telah mengalami degradasi (Teletchea *et al.* 2005; Lockley & Bardsley 2000; Mackie *et al.* 1999).

Gen COX1, 12S rRNA dan ND4L merupakan suatu gen penyandi untuk menyandikan enzim tertentu yang berperan pada proses respirasi sel di dalam mitokondria. Penelitian yang dilakukan oleh Baaka (2013), memperlihatkan bahwa gen COX1 dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk membedakan spesies *Tarsius* asal Sumatera dan Sulawesi. Menurut Zhang *et al.* (2000) sekuen gen ND4L oleh karena memiliki keragaman di dalam nukleotidanya dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk *Acipenseriformes*.

Dalam upaya menjaga eksistensi dan proteksi ancaman deforestasi yang menjadi masalah serius bagi kelestarian kuskus, maka perlu penelaahan satwa ini secara lebih rinci terutama pada tingkat genom dengan pemakaian metode molekuler. Hal tersebut penting dilakukan mengingat karakteristik serta informasi mengenai kuskus dapat diketahui dengan pasti agar langkah pelestarian dapat diambil secara maksimal. Menurut Widayanti *et al.* (2006), kajian ilmiah mengenai karakteristik genom satwa endemik masih terbatas sehingga perlu dilakukan penelitian yang dapat memberikan sumbangan informasi yang lebih akurat.

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk mengidentifikasi *Phalanger* sp. berdasarkan sekuen COX1, 12S rRNA, dan ND4L, mengkaji keragaman genetik dari *Phalanger* sp. asal Papua dan diharapkan dapat digunakan sebagai penanda genetik.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah membantu upaya pelestarian *Phalanger* sp. baik secara *in-situ* maupun *ex-situ*, pengembalian *Phalanger* sp. ke habitatnya (hasil konservasi *ex-situ* atau hasil penangkapan liar) serta diharapkan dapat mengungkap hubungan kekerabatan di antara famili *Phalangeridae*

D. Luaran Penelitian

Luaran dari Penelitian Hibah Bersaing ini di samping publikasi ilmiah dalam jurnal terakreditasi nasional dan seminar, juga menghasilkan data informasi untuk melakukan konservasi.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kuskus

Kuskus merupakan salah satu jenis satwa liar berkantung (Marsupialia) yang endemik di Indonesia Timur. Umumnya kuskus terdapat di Irian Jaya, Sulawesi, Maluku dan Pulau Timur. Kuskus merupakan binatang *arboreal* dengan ekor *prehensile*. Kinnaird (1995) menyatakan bahwa kuskus merupakan salah satu satwa hutan hujan tropis yang paling menarik dan lincah, yang melahirkan anaknya dengan ukuran yang sangat kecil dan belum sepenuhnya berkembang (dalam bentuk mudigah). Sejak kelahirannya sampai berumur 6-7 bulan, anak kuskus berada di kantung induknya yang berlapis rambut halus di bagian perut. Setelah agak besar, anak kuskus kadang-kadang terlihat di punggung induknya dengan ekor saling berjalanan. Kuskus adalah mamalia bermuka bundar yang bertelinga kecil, berbulu lebat serta bersifat *nocturnal* (aktif pada malam hari). Selain itu, menurut Nowak (1999), kuskus memiliki ciri-ciri yaitu, berbulu halus dan tebal, menyerupai wol pada semua genus kecuali *Wyulda*. Pakan yang paling disukai kuskus adalah buah-buahan, dedaunan, bunga dan batang dalam jumlah sedikit, serta serangga kecil.

Flannery *etal.* (1997) menyatakan bahwa famili Phalangeridae terbagi menjadi dua subfamili yaitu Ailuropinae dengan genus tunggal *Ailurops* dan Phalangerinae dengan genus *Strigocuscus*, *Trichosurus*, *Spilocuscus*, dan *Phalanger*. Klasifikasi kuskus genus *Phalanger* dan *Spilocuscus* menurut Temminck (1824) disitasi Flannery *etal.* (1987) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub Phylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Marsupialia
Famili	: Phalangeridae
Sub Famili	: Phalangerinae
Genus	: <i>Spilocuscus</i> : <i>Phalanger</i>
Spesies	: <i>Spilocuscus maculatus</i> : <i>Phalanger orientalis</i> : <i>Phalanger gymnotis</i> : <i>Phalanger ornatus</i>



A

B

Gambar 1. Kuskus dari Peg. Arfak, Manokwari, Papua Barat (A= sampel 1 dan B= sampel 2)

B. Perilaku Kuskus di Alam

Kuskus adalah hewan pemakan buah (*frugivorous*) dan pemakan daun (*folivorous*), tetapi ada pula kuskus yang pemakan segala (*omnivorous*). Penelitian Farida *etal.* (1999) menunjukkan bahwa di Irian Jaya, tercatat 56 jenis tumbuhan hutan yang dipilih kuskus sebagai sumber pakannya. Kuskus merupakan hewan akrobat gerak lambat, *nocturnal*, serta soliter. Pada siang hari, hewan tersebut beristirahat dan berlindung di dalam lubang batang pohon atau daun yang lebat. Kuskus memiliki kemampuan memanjat di antara dahan pepohonan dengan gerakan yang sangat cepat.

C. Konservasi

Endemisitas adalah konsep yang terpenting dalam konservasi spesies yang sebarannya terbatas di wilayah tertentu. Distribusi flora dan fauna secara menyeluruh dengan biogeografi dapat dipelajari, karena flora dan fauna dapat tersebar secara tidak acak, namun hanya dijumpai pada daerah-daerah tertentu. Oleh sebab itu, data sebaran biogeografi spesies tertentu dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi daerah endemisitas suatu fauna atau flora di suatu wilayah, yang nantinya dapat merancang suatu kawasan konservasi yang sesuai dengan sebaran daerahnya (Shekelle & Leksono, 2004).

Pendekatan secara genetika sangat penting dalam usaha pelestarian satwa. Variasi genetika sangat berarti terhadap kemampuan bertahan hidup suatu spesies dalam jangka pendek. Elektroforesis atau DNA sekuensing dapat digunakan untuk menentukan variasi genetika yang unik dalam suatu populasi yang khusus. Data genetika berkontribusi penting dalam taksonomi. Taksonomi tradisional selalu berdasarkan pada data morfologi yang mungkin disebabkan adanya adaptasi lokal atau kelenturan genetika. Dalam hal ini genetika dapat membantu memperjelas hubungan dan upaya pedoman konservasi ke arah penyebaran

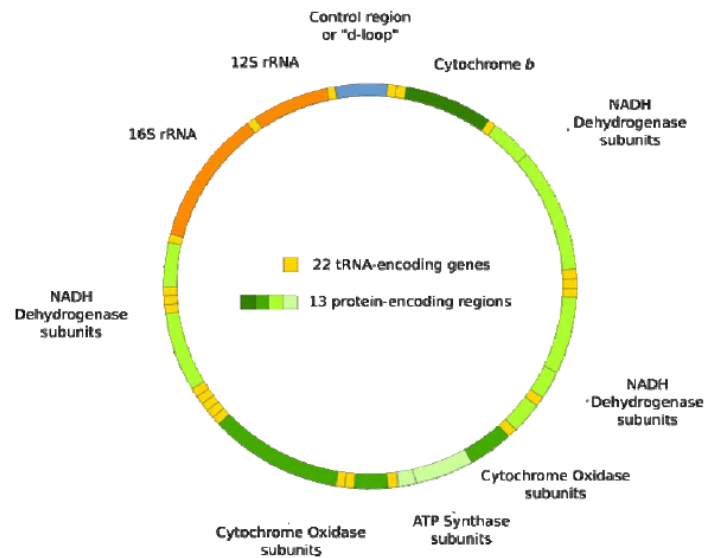
yang nyata atau taksa yang unik. Data genetika juga penting dalam program konservasi. Prinsip genetika dapat menjadi pedoman dalam seleksi stok induk, mengontrol struktur *breeding*, serta memonitor keseluruhan variasi genetika dan hilangnya variasi genetika di tempat konservasi.

D. DNA Mitokondria (mtDNA)

Mitokondria menempati porsi substansial dari volume sitoplasma, dan penting untuk evolusi pada hewan. Struktur mitokondria terdiri atas membran bagian luar dan membran bagian dalam, dan terdapat dua bagian dalam, yaitu matrik dan ruang antarmembran. Mitokondria berkaitan erat dengan metabolisme energi di dalam sel yang menghasilkan ATP. Multipel kopi dari DNA mitokondria (mtDNA) terdapat di dalam matrik, biasanya didistribusikan dalam bentuk nukleoid yang melekat pada membran bagian dalam mitokondria. DNA mitokondria merupakan penanda genetika paling populer dari keragaman molekuler pada hewan lebih dari tiga dekade yang lalu. DNA mitokondria merupakan solusi paling sesuai dan murah ketika suatu spesies baru dieksplorasi dalam bebas secara genetika. Kemampuan DNA mitokondria dalam memberikan informasi kajian molekuler didukung dengan laju evolusi DNA mitokondria yang sangat cepat, secara garis besar dianggap 5 hingga 10 kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan DNA inti pada beberapa spesies mammalia (Liedigk *et al.*, 2009; Vun *et al.*, 2011). Hal tersebut karena DNA mitokondria memiliki stabilitas tertinggi dan jumlah kopi yang paling tinggi dibandingkan DNA inti.

DNA mitokondria hewan berbentuk sirkuler, dengan panjang 15-20 kilobasa (kb), dan melibatkan sekitar 37 gen pengkode protein khusus terdiri atas 22tRNA, 2rRNA, dan 13mRNA yang mengambil bagian dalam sistem transpor elektron dan fosforilasi oksidatif. Suatu daerah kontrol (daerah tidak mengkode protein) dengan panjang lebih dari 1 kb merupakan tempat awal replikasi dan transkripsi. Pengaturan gen pada mtDNA umumnya tampak stabil, walaupun perbedaan dalam urutan gen dapat membedakan beberapa taksa hewan yang lebih tinggi. Hampir seluruh mtDNA terdiri atas gen yang mengkode protein (Avisé, 2004).

Genom mitokondria mamalia terdiri atas 13 gen pengkode protein, yaitu *NADHdehydrogenase* subunit 1,2,3,4L,4,5 dan 6, *cytokrom c oksidase* subunit 1,2 dan 3, *ATP sintase* subunit 6 dan 8; dua gen rRNA yaitu 12S rRNA, dan 16S rRNA; dan 22 gen tRNA(Hou *et al.*, 2006; Schmitz *et al.*, 2002). Susunan gen pada organisasi genom mitokondria disajikan pada Gambar 1.



Gambar 2. Genom mitokondria mamalia

(<http://www.mitomap.org/MITOMAP/mitomapgenome>)

Pada penelitian ini digunakan gen 12S rRNA karena gen tersebut memiliki daerah yg sangat homolog tetapi juga memiliki daerah yang bervariasi untuk tiap spesies (Dalmasso *et al.*, 2004; Ioja-Boldura *et al.*, 2011; Sakalar & Abasiyanik, 2011). Untuk itu dilakukan kajian karakteristik kuskus berdasarkan gen 12S rRNA mtDNA. Gen 12S rRNA adalah salah satu daerah *coding* dari 37 gen pada DNA mitokondria (mtDNA). Daerah mitokondria dikenal mengalami perubahan cepat dalam evolusi. Analisis restriksi dari mtDNA mamalia yang berhubungan dekat menunjukkan bahwa genom tersebut mempunyai laju evolusi yang lebih tinggi daripada DNA inti (Brown *et al.*, 1985; Kocher *et al.*, 1989). Di samping itu DNA mitokondria merupakan alat yang kuat dalam mempelajari evolusi hewan dan juga banyak digunakan untuk analisis struktur populasi, aliran gen, dan filogeni (Moritz *et al.*, 1974).

BAB III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 5 bulan dari bulan Juli sampai November 2014. Kegiatan yang dilakukan adalah survey lapangan dan mengambil sampel berupa darah di lokasi asal *Phalanger* sp. di Peg. Arfak, Manokwari, Papua Barat. Selanjutnya dilakukan analisis darah, yaitu isolasi DNA dan PCR dilaksanakan di Laboratorium Biotrop, Bogor.

B. Bahan Penelitian

Bahan untuk isolasi DNA adalah sampel darah berasal dari *Phalanger* sp. yang diperoleh di peg. Arfak, Manokwari, Papua Barat. Sampel berupa darah dari 2 ekor *Phalanger* sp. berjenis kelamin jantan. Darah diambil dengan *disposable syringe* 3 ml pada vena lateralis ekor atau vena sapena kaki. Kemudian darah dimasukkan ke dalam tabung untuk penyimpanan sampel yang telah berisi dengan 1mg anti-koagulan (heparin), dan diberi label. Selanjutnya tabung tersebut dikocok-kocok lalu disimpan dalam *cool box*.



Gambar 3. Pengambilan sampel darah dari vena lateralis ekor

Isolasi DNA menggunakan *kit QIAamp® DNA Blood* produksi Qiagen yang terdiri atas *lysis buffer* berkode AL, *tissue lysis buffer* berkode ATL, *wash buffer* pertama berkode AW1, *wash buffer* kedua berkode AW2, *elution buffer* berkode AE dan Proteinase K (10 mg/ml). Bahan-bahan lain yang digunakan yaitu *etanol absolute*, *KAPA* (KapaTaq DNA Polymerase, 0,4 mM untuk setiap komponen dNTP, *loading dye*, *buffer*, Mg^{2+}), ddH₂O, *aquabigest*, *primer forward* berkode COX1 F, *primer reverse* berkode COX1 R, *primer forward* berkode 12S rRNA F, *primer reverse* berkode 12S rRNA R, dan *primer forward* berkode ND4L F, *primer reverse* berkode ND4L R TBE 0,5X (*Tris base* 44,5 mM, *boric acid* 44,5 mM, EDTA 1 mM), *agarose* (SBS, Beijing, Genetech, Co. Ltd), *Good View* (10mg/ml) dan *marker DNA* 100bp (Geneaid), *Gliserin Bromphenol Blue* (GBB), *microfuge tube*, *nuclease free water* (Microzone).

Tabel 1. Primer oligonukleotida spesifik untuk amplifikasi gen COX1, ND4L, dan 12S rRNA

PRIMER			
Gen		Susunan basa	Σ Basa
COX1	F*	5' GCTCTTTTCAGCCATTTTACCC 3'	21
	R	5' GTGGTTATGAGGTTGGCTTGA 3'	21
ND4L	F	5' TCCTTATTCTCCCCGGATTT 3'	20
	R	5' TAGGGGGTTCAATTCCTTCC 3'	20
12S rRNA	F	5'CAGTGAGAATGCCCTCAAAA3'	20
	R	5'CTCCAAGTGCACCTTCCAGT3'	

Keterangan: F*= *forward*; R*= *reverse*

C. Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan yaitu mikropipet (Gilson) dengan ukuran 200 sampai 1000 μ l, mikropipet (*Nichipet*) dengan ukuran 20 sampai 100 μ l, 2 sampai 20 μ l dan 1 sampai 10 μ l, tip pipet (biru, kuning, putih), *disposable syringe* 3 ml, penangas air (Eyla, Uni Thermo Shaker NTS 3000), *sentrifuge* (5804R), *freezer*, seperangkat mesin PCR, perangkat elektroforesis, *microwave*, seperangkat pencetak agar (plat dan sisir pencetak sumuran), *balance*, *magnetic stirrer*, *vortex mixer*, *spin down*, gelas ukur, sarung tangan, tabung erlenmeyer dan UVtransluminator.

D. Prosedur Kerja

1. Isolasi DNA Total

Isolasi DNA total dari sampel darah dengan menggunakan kit QIAamp® DNA Blood produksi Qiagen (yang berisi *buffer AL*, *buffer ATL*, *buffer AW1*, *buffer AW2*, *buffer AE*) dan *proteinase K* yang digunakan untuk melisiskan membran pada sel darah dan juga mendegradasi enzim-enzim DNase dan protein lainnya untuk menghindari degradasi DNA terutama DNA mitokondria pada larutan sampel. Proses isolasi diawali menghomogenisasi sampel dengan disentrifus kecepatan 8.000 rpm selama satu menit dalam suhu ruang. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke *microcentrifuge tube* 1,5 ml yang baru. Langkah selanjutnya dilakukan penambahan etanol absolut sebanyak 200 μ l, kemudian divortex selama 15 detik.

Semua larutan dan presipitat diambil dengan mikropipet dan dipindahkan dalam kolom (terdapat filter dan di bawahnya telah dipasang *collection tube*). Setelah itu larutan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 8.000 rpm selama satu menit. Larutan yang tersaring di dalam *collection tube* dibuang. Dalam kolom ditambahkan 500 μ l *buffer AW1*, larutan

disentrifugasi lagi dengan kecepatan 8.000 rpm selama satu menit. Larutan yang tersaring di *collection tube* dibuang seperti pada langkah sebelumnya. *Buffer* AW2 sebanyak 500 µl ditambahkan dalam kolom, setelah itu larutan disentrifus kembali dengan kecepatan 8.000 rpm selama satu menit. Larutan yang tersaring pada *collection tube* dibuang, kemudian disentrifus dalam kecepatan 10.000 rpm, pada suhu ruang selama lima menit. Larutan yang tersaring di *collection tube* dibuang.

Setelah itu, kolom (penyaring) dipindahkan pada *microcentrifuge tube* 1,5 ml, kemudian ditambahkan *buffer* AE sebanyak 50 µl dalam kolom (penyaring). Larutan dalam kolom didiamkan pada suhu kamar selama lima menit. *Tube* yang berisi kolom tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama satu menit. Proses diulangi sekali lagi dimulai dari penambahan *buffer* AE sebanyak 50 µl. Larutan yang tersaring di bawah merupakan hasil isolasi DNA. DNA hasil isolasi disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C. Hasil isolasi DNA dicek atau diidentifikasi dengan gel agarose 1%.

Desain Primer (Tabel 1) didisain sendiri karena belum terdapat di data genbank. Desain primer berdasar data sekuen genom mitokondria kerabat terdekat *Phalanger*, yaitu *Tricosurus*, menggunakan program primer3.online.

2. Amplifikasi Gen COX1, 12S rRNA, dan ND4L

7

Hasil isolasi DNA digunakan untuk cetakan pada proses amplifikasi dengan metode PCR. Campuran reaksi PCR untuk satu reaksi adalah sebanyak 40 µl terdiri atas 20 µl *KAPA*, 2 µl untuk masing-masing primer 1 dan 2 masing-masing dengan konsentrasi 10 pmol, 1 µl DNA total dan untuk memenuhi volume satu reaksi ditambahkan ddH₂O dengan volume 17 µl hingga mencapai konsentrasi 40 µl.

Kondisi PCR untuk amplifikasi gen COX1 dan ND4L sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94° C, selanjutnya diikuti dengan 94° C selama 30 detik, 54° C selama 45 detik, 72° C selama 1,5 menit; reaksi amplifikasi sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 5 menit pada 72° C. Sedangkan untuk gen 12S rRNA dengan kondisi PCR sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94° C selanjutnya diikuti dengan 94° C selama 1 menit 30 detik untuk denaturasi, 48,7° C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72° C selama 1 menit untuk pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri 5 menit pada 72° C.

3. Elektroforesis hasil PCR Gen COX1, 12S rRNA, dan ND4L

Proses elektroforesis dengan gel agarose dilakukan untuk melihat hasil isolasi DNA dan PCR. Proses yang dilakukan pertama kali adalah pembuatan gel. Konsentrasi gel yang digunakan untuk elektroforesis hasil PCR adalah 1 % yaitu 0,25 gram agarose dilarutkan dalam 25 ml TBE 0,5X atau 0,5 gram agarose dalam 50 ml TBE 0,5X dipanaskan dengan *microwave* hingga mendidih. Setelah itu dalam gel cair ditambahkan *Good View* sebagai pewarna sebanyak 2 μ l untuk volume gel 25 ml dan 4 μ l untuk volume gel 50 ml. Larutan agarose ditunggu hingga mencapai suhu sekitar 55°C, kemudian larutan agarose dituangkan dalam plat pencetak agar, selanjutnya sisir pencetak sumuran dipasang.

Setelah gel mengeras, plat yang berisi gel agarose diletakkan dalam tangki elektroforesis yang berisi larutan *buffer* sesuai dengan *buffer* yang digunakan untuk membuat gel agarose yaitu TBE 0,5X. Sampel hasil isolasi DNA dan PCR sebanyak 3 μ l diambil dengan mikropipet kemudian dicampurkan dengan *Gliserin Bromphenol Blue* (GBB) sebanyak 1 μ l dan dimasukkan dalam sumuran gel agarose. Elektroforesis dilakukan dengan arus listrik 80 volt dan ditunggu hingga proses selesai ± 30 menit. Fragmen molekul DNA diamati dengan bantuan UV transluminator ($\lambda = 260$ nm), sedangkan panjang DNA hasil amplifikasi dapat diketahui dengan penanda DNA yang berukuran 100 basepair (bp).

5. Analisis Data

Penjajaran berganda sekuen nukleotida gen COX1, 12S rRNA, dan ND4L dianalisis dengan bantuan perangkat lunak Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Analisis hasil berdasarkan sekuen nukleotida gen COX1, 12S rRNA, dan ND4L dengan bantuan perangkat lunak MEGA versi 5.1.

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Isolasi DNA prinsip utamanya yaitu penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat misalnya selulosa dan protein. Isolasi total DNA berasal dari sampel 1 dan 2 berhasil dilakukan, selanjutnya dilakukan pengecekan kualitas DNA. Hasil pengecekan kualitas DNA dengan menggunakan gel elektroforesis 1% menunjukkan hasil yang cukup bagus, nampak bahwa DNA yang diperoleh utuh (Gambar 4). DNA yang utuh ditandai dengan tidak adanya *smear* DNA yang dielektroforesis. Hal tersebut menjadi penting karena pada proses PCR, DNA yang utuh akan memberikan hasil yang relatif lebih akurat.



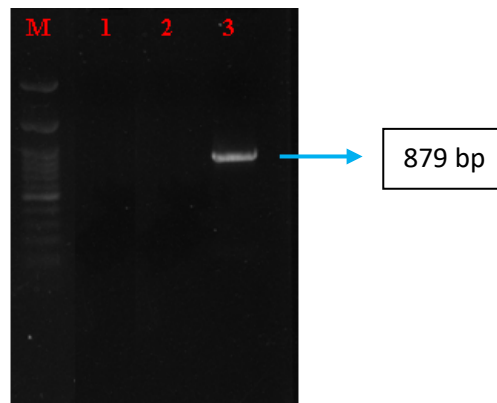
Gambar 4. Elektroforesis hasil isolasi DNA

Keterangan 1: Sampel 1

2: Sampel 2

DNA total hasil isolasi digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen COX1, ND4L, dan 12S rRNA dengan PCR. Hasil PCR tersebut dianalisis dengan metode elektroforesis gel agarosa. Visualisasi Hasil PCR dapat dilihat di bawah sinar UV. Amplifikasi gen COX1, ND4L, dan 12S rRNA menggunakan primer COX1, ND4L, dan 12S rRNA hanya terjadi pada gen 12S rRNA yang menghasilkan produk PCR sepanjang 879 pasang basa (bp). Produk PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarosa 1,5% dengan menggunakan *buffer* 1xTBE dalam piranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA). Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar ultraviolet ($\lambda = 260 \text{ nm}$) setelah gel diwarnai dengan DNA *staining* (*1st Base*). Penanda DNA dengan ukuran 100 bp (*1st Base*) digunakan sebagai penunjuk panjang basa nukleotida Produk PCR gen-gen tersebut disajikan pada Gambar 5 dan 6.

Hasil PCR tersebut kemudian digunakan untuk sequencing. Tujuan dari sekuensing untuk menganalisis urutan nukleotida sampel.



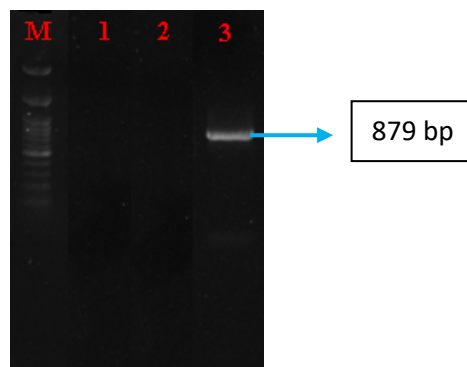
Gambar 5. Elektroforesis hasil amplifikasi gen COX1, ND4L, dan 12S rRNA sampel 1 pada gel agarose 1,5%

Keterangan M : Marker DNA Ladder 100 bp

1 : gen COX1

2 : gen ND4L

3 : gen 12S rRNA



Gambar 6. Elektroforesis hasil amplifikasi gen COX1, ND4L, dan 12S rRNA sampel 2 pada gel agarose 1,5%

Keterangan M : Marker Ladder 100 bp

1 : gen COX1

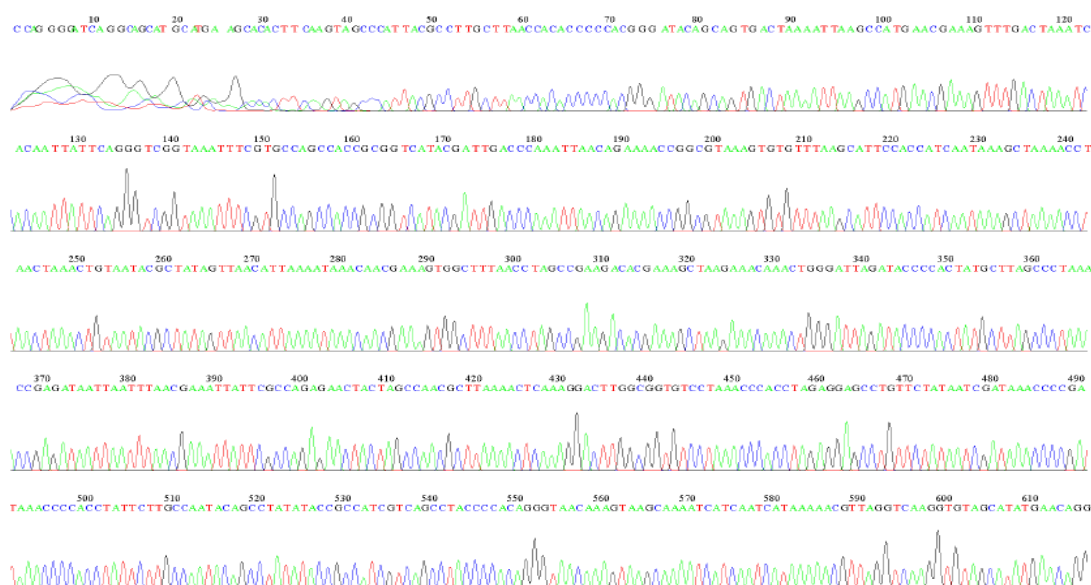
2 : gen ND4L

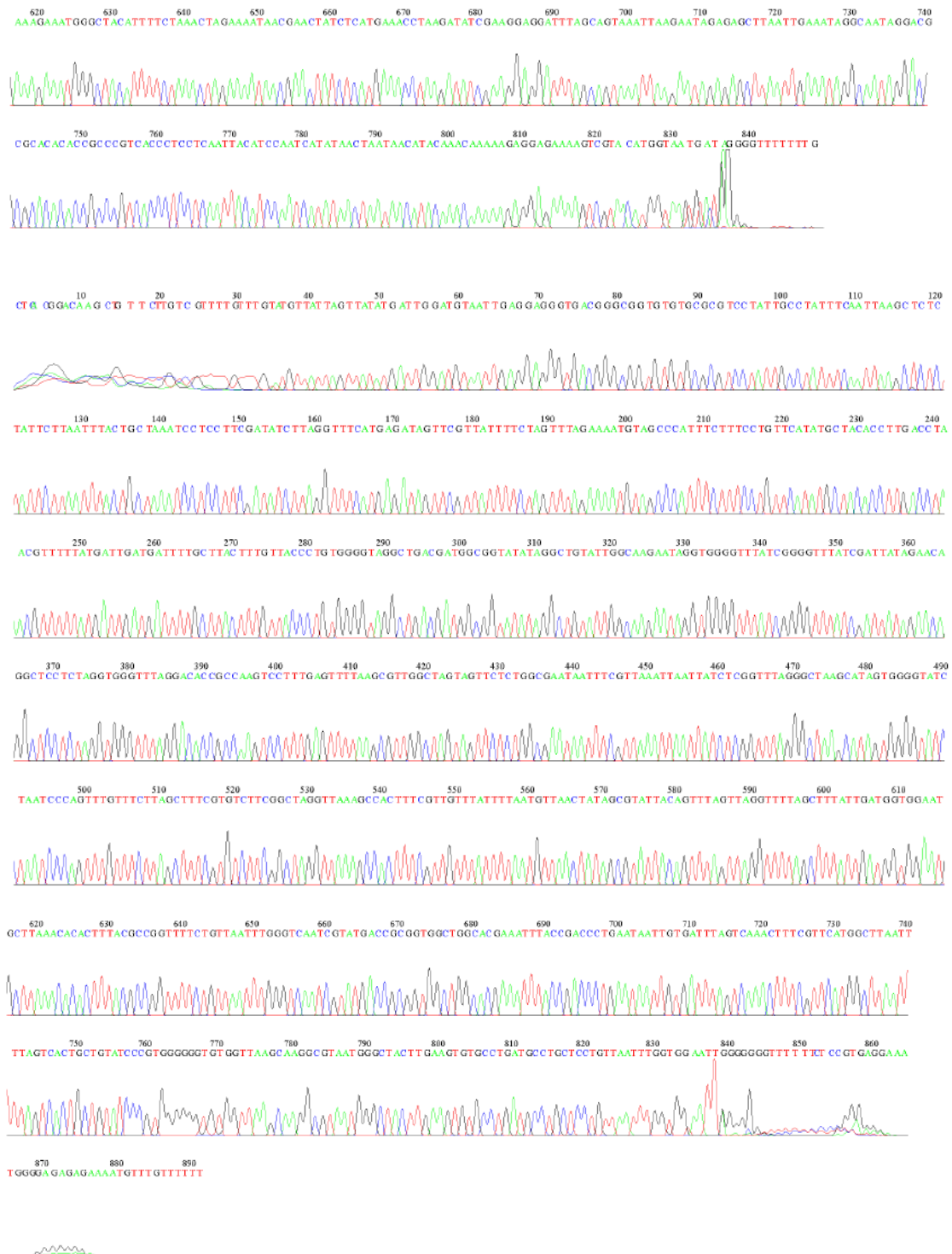
3 : gen 12S rRNA

Berdasarkan elektroforesis (Gambar 5 dan 6) diketahui bahwa hanya terdapat pita/band pada kolom ke 3 yaitu gen 12S rRNA. Pada kedua sampel 1 dan 2, kolom ke 3 tersebut gen 12S rRNA teramplifikasi dengan baik, sedangkan baik sampel 1 dan 2 pada kolom 1 dan 2 (gen COX1 dan ND4L) tidak terdapat pita atau *band*. Hal tersebut berarti gen COX1 dan ND4L tidak teramplifikasi dengan baik. Kemungkinan tidak teramplifikasinya gen tersebut adalah primer yang digunakan belum spesifik atau memiliki tingkat similaritas yang rendah. Primer merupakan suatu rangkaian nukleotida yang akan digunakan sebagai inisiasi

terjadinya replikasi DNA. Pemilihan primer oligonukleotida yang selektif memegang peranan penting dalam amplifikasi DNA (PCR), oligohibridisasi, dan pengurutan DNA. Faktor yang penting dalam analisis DNA adalah dalam merancang primer yang tepat (Abd-Elsalam, 2003). Primer yang akan dipilih untuk melekat pada target sekuens harus memenuhi beberapa kriteria seperti panjang primer, konsentrasi guanin-sitosin, temperatur pelekatan, temperatur leleh, stabilitas 5' end dan spesifitas 3' end (Abd-Elsalam, 2003). Dalam merancang primer diperlukan data atau informasi yang cukup mengenai gen spesies *Phalanger* sp. Untuk spesies –spesies yang belum pernah dilakukan analisis secara molekuler sehingga dalam pembuatan atau perancangan primernya digunakan kerabat terdekatnya yang masih 1 famili. Hal tersebut yang dapat menjadi kendala dalam merancang gen yang spesifik untuk *Phalanger* sp. Pada penelitian ini digunakan 2 macam primer, yaitu primer yang umum (gen 12S rRNA) dan spesifik (gen COX1 dan ND4L). Dari hasil penelitian yang berhasil teramplifikasi dan disekuensing yaitu gen dengan primer yang umum (12S rRNA).

Hasil sekuensing gen 12S rRNA yang diperoleh berupa elektroforegram (Gambar 7-8) Tampak perbedaan warna puncak-puncak pada elektroforegram menunjukkan bahwa ada perbedaan jenis basa. Satu warna puncak elektroforegram merupakan representasi satu basa yang mempunyai intensitas berbeda dengan notasi yang berbeda-beda. Notasi A untuk basa Adenin, C untuk basa sitosin, G untuk basa Guanin dan T untuk basa timin, sedangkan notasi N punya arti puncak tersebut tidak jelas karena bertumpuk-tumpuk beberapa puncak pada satu posisi atau terlalu rendahnya puncak yang dihasilkan dari nukleotoda. Notasi N ini dapat diperbaiki dan diganti secara manual dengan notasi yang sesuai.





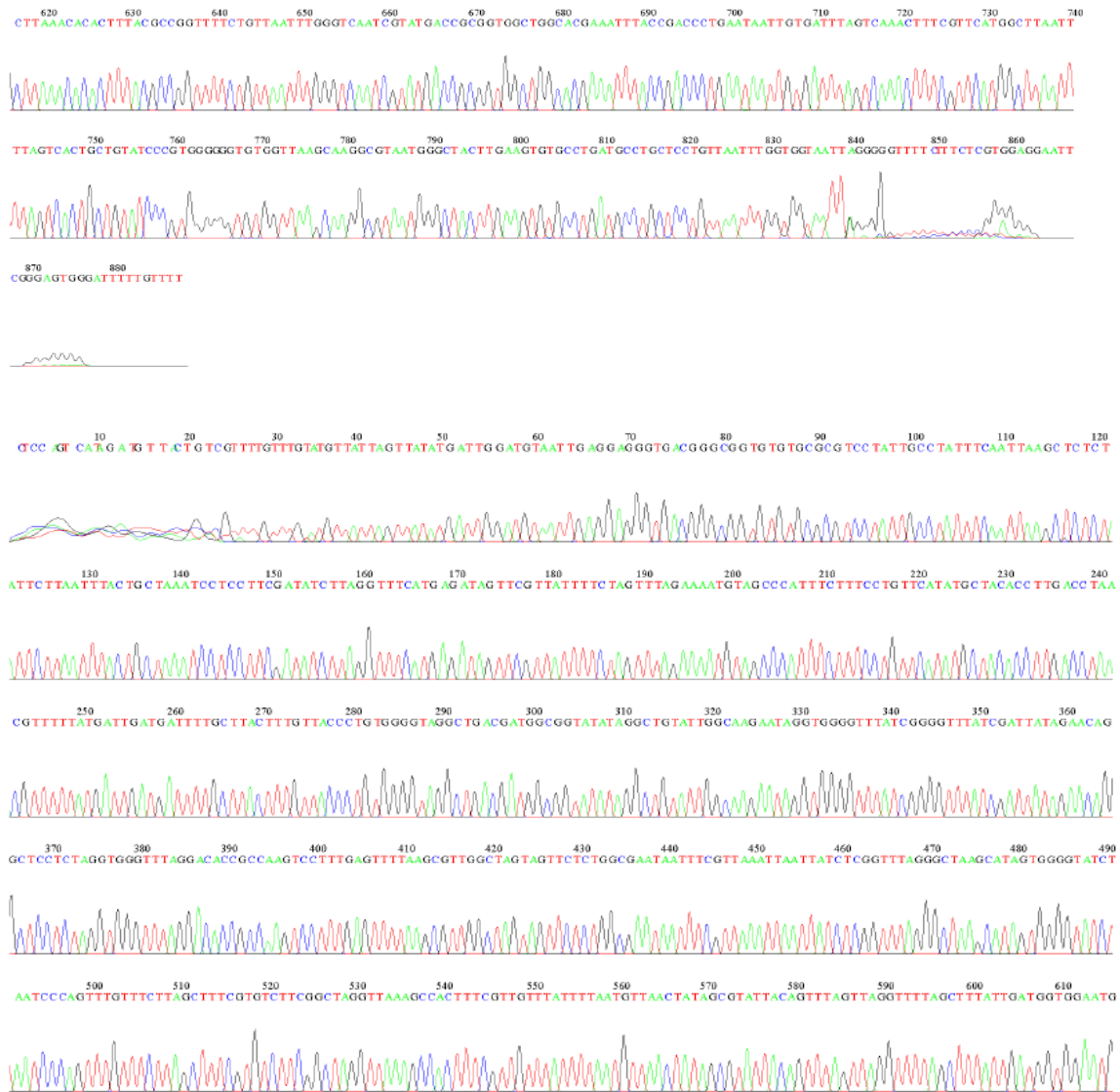
Gambar 7. Elektroforegram sampel 1

```
>141117-03_M07_16_12S_RNA_F.ab1      855
TCCGGAAACAGGGGGGATGGCAGAAGGACACTTCAAGTAGCCCATACGC
CTTGCTTAACACACCCCCACGGGATACAGCAGTGACTAAAATTAAGCCA
TGAACGAAAGTTTGACTAAATCACAATTATTCAGGGTCGGTAAATTTCTG
GCCAGCCACCGCGGTTCATACGATTGACCCAAATTAACAGAAAACCGGCGT
AAAGTGTGTTTAAGCATTCCACCATCAATAAAGCTAAAACCTAACTAAAC
TGTAATACGCTATAGTTAACATTAAAATAAACAACGAAAGTGGCTTTAAC
CTAGCCGAAGACACGAAAGCTAAGAAACAACTGGGATTAGATACCCAC
TATGCTTAGCCCTAAACCGAGATAATTAATTTAACGAAATTATTCGCCAG
AGAATACTAGCCAACGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGTCCTAAA
```

CCCACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCCAC
 CTATTCTTGCCAATACAGCCTATATACCGCCATCGTCAGCCTACCCACA
 GGGTAACAAAGTAAGCAAAATCATCAATCATAAAACGTTAGGTCAAGGT
 GTAGCATATGAACAGGAAAAGAAATGGGCTACATTTTCTAAACTAGAAAAT
 AACGAACTATCTCATGAAACCTAAGATATCGAAGGAGGATTTAGCAGTAA
 ATTAAGAATAGAGAGCTTAATTGAAATAGGCAATAGGACGCGCACACACC
 GCCCGTCACCCTCCTCAATTACATCCAATCATATACTAATAACATACAA
 ACAAAAAGAGGAGAAAAGTCGTACATGGTAATGATAGGGGCCCTTGGGGG
 TGCAG

Sampel 2





Gambar 8 elektroforegram sampel 2

12S rRNA R

>141117-03_O07_16_12S_RNA_R.ab1 888

```
CTCCAGTCATAGATGTTACTGTCGTTTGTGTTGATGTTATTAGTTATAT
GATTGGATGTAATTGAGGAGGGTGACGGGCGGTGTGTGCGCGTCCATTG
CCTATTTCAATTAAGCTCTCTATTCTTAATTTACTGCTAAATCCTCCTC
GATATCTTAGGTTTCATGAGATAGTTCGTTATTTTCTAGTTTAGAAAATG
TAGCCCATTTCTTCTGTTTCATATGCTACACCTTGACCTAACGTTTTTA
TGATTGATGATTTTGCTTACTTTGTTACCTGTGGGGTAGGCTGACGATG
GCGGTATATAGGCTGTATTGGCAAGAATAGGTGGGGTTTATCGGGGTTTA
TCGATTATAGAACAGGCTCCTCTAGGTGGGTTTAGGACACCGCCAAGTCC
TTTGAGTTTTTAAGCGTTGGCTAGTAGTCTCTGGCGAATAATTTTCGTTAA
ATTAATTATCTCGGTTTAGGGCTAAGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGT
TTGTTTCTTAGCTTTCGTTCTTCGGCTAGGTTAAAGCCACTTTCGTTGT
TTATTTTAATGTTAACTATAGCGTATTACAGTTTAGTTAGGTTTTCGTT
TATTGATGGTGGAATGCTAAACACACTTACGCCGGTTTCTGTTAATT
TGGGTCAATCGTATGACCGCGGTGGCTGGCACGAAATTTACCGACCCTGA
ATAATTGTGATTTAGTTCAAACTTTCGTTTCATGGCTTAATTTTAGTCACTG
CTGTATCCCGTGGGGGGTGTGGTTAAGCAAGGCGTAATGGGCTACTTGAA
GTGTGCCTGATGCCTGCTCCTGTTAATTTGGTGGTAATTAGGGGGTTTTC
TTTCTCGTGGAGGAATTCGGGAGTGGGATTTTGTGTTT
```

Setelah hasil sekuensing tersebut di-copy dan dimasukkan ke dalam *blast* pada www.ncbi.nlm.nih.gov, maka muncullah species-species yang memiliki sekuens tersebut. Diantaranya termasuk *Phalanger* sp.

Sampel 1

Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected: 0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Phalanger maculatus isolate S37 tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence	1465	1465	94%	0.0	99%	AF108222.1
<input type="checkbox"/> Phalanger maculatus isolate F81 tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence	1465	1465	94%	0.0	99%	AF108220.1
<input type="checkbox"/> Spilococcus maculatus voucher ABTC49143 mitochondrion, partial genome	1435	1435	94%	0.0	99%	KJ868160.1
<input type="checkbox"/> Phalanger rufoniger tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence; and	1321	1321	94%	0.0	96%	AF108221.1
<input type="checkbox"/> Phalanger lulululae tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence; and 1	1230	1230	94%	0.0	94%	AF108219.1
<input type="checkbox"/> Phalanger orientalis 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	1221	1221	94%	0.0	94%	U33496.1
<input type="checkbox"/> Phalanger gymnotis tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence; and	1199	1199	94%	0.0	93%	AF108218.1
<input type="checkbox"/> Phalanger gymnotis voucher ABTC44950 mitochondrion, partial genome	1173	1173	94%	0.0	93%	KJ868142.1
<input type="checkbox"/> Phalanger vestitus mitochondrial DNA, nearly complete genome	1109	1109	94%	0.0	92%	AB241057.1
<input type="checkbox"/> Trichosurus vulpecula mitochondrion, complete genome	1107	1107	94%	0.0	92%	AF357238.1

Sampel 2

Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected: 0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Phalanger maculatus isolate S37 tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence	1482	1482	91%	0.0	99%	AF108222.1
<input type="checkbox"/> Phalanger maculatus isolate F81 tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence	1482	1482	91%	0.0	99%	AF108220.1
<input type="checkbox"/> Spilococcus maculatus voucher ABTC49143 mitochondrion, partial genome	1459	1459	91%	0.0	99%	KJ868160.1
<input type="checkbox"/> Phalanger rufoniger tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence; and	1321	1321	91%	0.0	96%	AF108221.1
<input type="checkbox"/> Phalanger lulululae tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence; and 1	1218	1218	89%	0.0	94%	AF108219.1
<input type="checkbox"/> Phalanger orientalis 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	1199	1199	88%	0.0	94%	U33496.1
<input type="checkbox"/> Phalanger gymnotis tRNA-Phe gene, partial sequence; 12S ribosomal RNA gene, complete sequence; tRNA-Val gene, complete sequence; and	1184	1184	91%	0.0	93%	AF108218.1
<input type="checkbox"/> Phalanger gymnotis voucher ABTC44950 mitochondrion, partial genome	1166	1166	91%	0.0	93%	KJ868142.1
<input type="checkbox"/> Phalanger vestitus mitochondrial DNA, nearly complete genome	1103	1103	88%	0.0	92%	AB241057.1
<input type="checkbox"/> Trichosurus vulpecula mitochondrion, complete genome	1101	1101	90%	0.0	91%	AF357238.1
<input type="checkbox"/> Trichosurus vulpecula 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	1096	1096	90%	0.0	91%	AY245622.1

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa berdasarkan sekuen 12S rRNA dapat mengidentifikasi *Phalanger* sp., sedangkan sekuen COX1 dan ND4L belum berhasil digunakan untuk mengidentifikasi *Phalanger* sp. dengan dapat digunakannya sekuen tersebut untuk identifikasi akan memudahkan dan menguatkan untuk identifikasi kuskus tidak saja secara morfologi tetapi didukung oleh identifikasi secara molekuler.

B. Saran

Berdasarkan simpulan di atas, maka saran yang diajukan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melengkapi data molekuler *Phalanger* sp. dengan primer yang lebih spesifik dan membandingkannya dengan species *Phalanger* yang terdapat di Ambon atau di Sulawesi, sehingga dapat diketahui hubungan kekerabatan kelompok *Phalanger* yang ada di Indonesia

BAB VII. DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elsalam, K.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology* vol 2 (5):91-95
- Awise, J. C. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Conservation International. 1999. Lokakarya Penentuan Prioritas Konservasi Keanekaragaman Hayati Irian Jaya. C.I, Jayapura
- Farida, W.R. G. Semiadi, & H. Dahrudin. (1999). Pemilihan jenis-jenis tumbuhan sebagai tempat bersarang dan sumber pakan kuskus (famili Phalangeridae) di Irian Jaya. *Jurnal Biologi Indonesi* 2 (5): 235-243.
- Flannery, T., M. Archer, & G. Maynes. 1987. The phylogenetic relationships of living Phalangerids (Phalangerioidea: Marsupialia) with a suggested new taxonomy. In Arther, M. (ed.). *Possum and Opossum, Studies in Evolutions*. Sydney: Surrey Beatty & Sons and The Royal Zoological Society of New South Wales.
- Hou, W., Y. Chen, X. Wu, J. Hu, Z. Peng, J. Yang, Z. Tang, C. Zhou, Y. Li, S. Yang, Y. Du, L. Kong, Z. Ren, H. Zhang & S. Shui. (2006). A Complete Mitochondrial Genome sequence of Asian Black bear Sichuan Subspecies (*Ursus thibetanus mupinensis*). *Int. J. Biol. Sci.* 3(2):85-90
- Kinnaird, M.F. 1995. *North Sulawesi: A Natural History Guide*. Jakarta:Development Institute Wallacea.
- Liedigk, Rasmus., Thinh, Van Ngoc., Nadler, Tilo., Walter, Lutz., & Roos, Christian. 2009. Evolutionary History and Phylogenetic Position of the Indochinese Grey Langur (*Trachypithecus crepusculus*). *Vietnamese Journal of Primatology*, 3: 1-8
- Lockley, A.K.& Bardsley, R.G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*. 11(2): 67-77.
- Mackie, I.M., Pryde, S.E., Sotelo, C.G., Medina, I., Martin, R.P., Quinteiro, J., Mendez, M.R., & Rehbein, H. (1999). Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science & Technology*. 10(1): 9-14.
- Nowak, R.M. (1999). Walker's Mammals of the world. 6Th. Ed. Vol 1. The Jhon Hopkins University Press
- Schmitz, J., Ohme, M., & Zischler, H. (2002). The Complete Mitochondrial Sequence of *Tarsius bancanus*: Evidence for an extensive nucleotide Compositional Plasticity of Primate Mitochondrial DNA. *Mol Biol. Evol.* 19:544-553

- Shekelle, M.& Leksono, S.M. (2004). Strategi Konservasi di Pulau Sulawesi dengan menggunakan *Tarsius* sebagai Flagship Species. *Biota* 9:1-10
- Teletchea, F., Celia Maudet, & Catherine Hanni. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology* 23(7):359-366.
- Vun, V.F., Mahani, M.C., Lakim, M., Ampeng, A., & Md-Zain, B.M. 2011. Phylogenetic Relationships of Leaf Monkeys (*Presbytis*; Colobinae) based on Cytochrome-b and 12S rRNA Genes. *Genetic and Molecular Research*, 10 (1): 368-381
- Widayanti, R. (2006). Kajian Penanda Genetik Gen Cytochrome b dan Daerah D-Loop pada *Tarsius* sp. Program Studi Primatologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Zhang, S., Zhang, Y., Zheng, X., Chen, Y., Deng, H., Wang, D., Wei, U., Zang, Y., Nie, vL., & Wu, Q. (2000). Molecular phylogenetic systematics of twelve species of Acipenseriformes based on mtDNA ND4L-ND4 gene sequence analysis. *Sci. China, C, Life Sci.* 43 (2): 129-37.